第 40 卷 第 3 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 40, No. 3
1997 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1997

林氏果蝇线粒体 DNA 分析*

温硕洋　　谢　力　　彭统序

（广东省昆虫研究所　广州　510260）

摘要　本文对 Tamura (1988) 提纯 mtDNA 的方法进行改进，建立了林氏果蝇 *Drosophila lini* 线粒体 DNA 大量制备的方法；对采自原产地台湾省的单雌品系 TAW3 146.1的线粒体 DNA 用10种限制性内切酶进行了酶切，得出了林氏果蝇 mtDNA 的分子量大小为16.3 kb；用双酶切法制作了林氏果蝇线粒体 DNA 酶切图谱，并与属于同一复合种组的 *D. kikkawai* 的酶切图谱进行比较。所用的内切酶有 *Xba* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Eco*RV、*Sca* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Pvu* Ⅱ、*Bam*H Ⅰ、*Pst* Ⅱ。

关键词　林氏果蝇，线粒体 DNA，限制性内切酶，酶切图谱

动物线粒体 DNA (mtDNA) 的研究已成为进化遗传研究的重要手段，因为从中获得的信息能够更直接地分析遗传上的变化。多细胞动物的 mtDNA 以它基因组小（约为最小核基因组的1/25 000）；容易提纯；没有基因重组，不含基因间隔区以及母系遗传等四大特点被广泛应用于分子进化研究中。果蝇科线粒体 DNA 的研究始于70年代，*melanogaster* 种组（species gruop）是研究较活跃的类群之一。mtDNA 的研究为分子进化提供了有价值的比较生物学的资料，而分子生物学的发展，特别是方法上的进步，又大大提高了进化研究的水平。

mtDNA 提纯方法的不断改进，是促进这方面研究得以迅速发展的重要原因。氯化铯超速离心法曾通用一时，但因该法既费时又需要昂贵的实验设备而未被广泛应用。1983年及1987年 Powell 等及 Carr 等分别报道了简化快速的分离法，但仍不够简易且 mtDNA 的得率低，1988年 Tamura 等把 Maniatis 等用于提纯质粒 DNA 的碱变性法加以改进，使 mtDNA 的提纯更加快速高效[1]。本文采用1988年 Tamura 等的方法，在某些步骤上进行了改进，使得更加适合林氏果蝇 mtDNA 样品的大量制备。

林氏果蝇 *Drosophila lini* (Bock & Wheeler) 属于果蝇科 Drosophilidae，*melanogaster* 种组（species group）*montium* 种亚组（species subgroup）*kikkawai* 复合种组（complex），是国际上物种分化研究的热点之一。该种原产地是我国台湾省，分布于我国南方及东南亚，后来在缅甸和我国广东等地采到的种群，在生化遗传分析和杂交试验中，发现某些种群与台湾种群有明显的生殖隔离[2,3]。为了更深入地了解林氏果蝇物种分化的程度及物种分化的机制，我们先把采自台湾的 TAW3 416.1进行了 mtDNA 分子量大小的测量和酶切图谱的制作，并与 *D. kikkawai* 的酶切图谱进行了比较，为林氏果蝇的 mtDNA 多态性

* 国家自然科学基金资助项目，编号为39170131

1995-10-18收稿，1996-08-27收修改稿

及其物种分化研究奠定了基础。林氏果蝇各种群 mtDNA 多态性比较及进化分析，将另文发表。

1 材料与方法

1.1 单雌系的保存

单雌系 TAW3 146.1于1968年采自台湾（Texas old stock no. 3 146.1），在本实验室保存于标准果蝇饲料中（玉米粉，蔗糖，干酵母，琼脂）。保存条件：温度为（25±1）℃，湿度为60 %，光周期为14L:10D。

1.2 试剂

限制性内切酶、RNase、λDNA 为 Boehringer Mannheim 公司产品，SDS 为 Serva 公司产品，部分琼脂糖购自北京中山生物技术有限公司，其他试剂为日本产和国产 A,R 级。

1.3 线粒体 DNA 提纯

参照 Tamura 的方法并加以改进。取1 g 活成蝇（3日龄以后），用15 mL 预冷匀浆缓冲液（0.25 mol/L 蔗糖、10 mmol/L EDTA、30 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5）在研钵中研磨（冰浴中），然后用纱布过滤，用5 mL 预冷的匀浆缓冲液洗纱布及滤渣，将滤液装入预冷的50 mL 电动匀浆器（2 000 r/min）中上下匀浆5次，使大多数细胞被破碎。将匀浆液分装于两支离心管中，加缓冲液至每管30 mL，在1 000 g，4 ℃离心10 min，以沉淀细胞核及细胞碎片。取上清液在12 000 g、4 ℃高速离心20 min 沉淀线粒体。弃上清液并加1 mL STE 缓冲液（10 mmol/L Tris-EDTA 缓冲液，pH 8.0，含0.15 mol/L NaCl，10 mmol/L EDTA）混匀后移入1.5 mL 离心管中，在12 000 g、4℃高速离心5 min，弃上清液，加入 STE 缓冲液至100 μL 总体积。加入200 μL 含 NaCl 的1 % SDS 溶液（1份10% SDS 加9份2 mol/L NaOH，新鲜配制），在小型电动混合器上混匀，置冰浴5 min，再加入150 μL 预冷醋酸钾溶液（3 mol/L potassium、5 mol/L acetate）在混合器上混匀，置冰浴5 min，然后在12 000 g、4 ℃高速离心5 min。取上清液，加等体积的酚-氯仿溶液（1份饱和酚、1份氯仿：异丙醇（24:1）），混合器上充分混匀，在12 000 g、室温高速离心5 min。将水相移至1.5 mL 离心管，加0.8倍体积的异丙醇，混合器上混匀，在室温下保存1 h 后在12 000 g、室温高速离心10 min，沉淀为 mtDNA。加1 mL 70%乙醇清洗 mtDNA，在12 000 g、室温高速离心5 min，真空干燥 mtDNA 约2 min，每管加50～85 μL TE+RNase 缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，含1 mmol/L EDTA 及20 μg/mL RNase），贮存于−20 ℃下待用。

1.4 mtDNA 限制性内切酶酶解

取8.5 μL mtDNA 于0.5 mL 灭菌离心管中，加入1.0 μL 酶缓冲液，0.5 μL 酶，在37 ℃恒温水浴保温2 h，用2 μL 加样缓冲液（0.25%溴酚蓝、0.25%二甲苯青 FF、40%（w/v）蔗糖水溶液）终止酶解。使用的内切酶有：*Xba* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Sac* Ⅰ、

Sca Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Pvu* Ⅱ、*Bam*H Ⅰ、*Pst* Ⅰ。

1.5 电泳

使用 TPE 缓冲液（0.08 mol/L Tris-磷酸缓冲液、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L NaCl）制作0.7%的琼脂糖凝胶、在样品槽中分别加入所需分析的样品及分子量 Marker（*Sty* Ⅰ酶切的 λDNA），50 V 电压下电泳2.5 h，电泳完毕后将凝胶置于溴化乙锭染色液（1 μg/mL）中染色30 min，在紫外灯下拍照。

1.6 分子量的测量及酶切图谱的制作

根据 mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱，以10次重复的平均值确定 mtDNA 分子的大小。用双酶切法进行酶切图谱的制作。

2 结果

每次研钵研磨，纱布过滤预处理1 g 果蝇的大量制备所得 mtDNA 可以用于12～20次酶切反应，mtDNA 得率约为0.6～1 μg/g。

本实验一共使用了10个内切酶对 TAW3 146.1的 mtDNA 进行酶切，得出其分子量大小为16.3 kb。所用的10个酶除了 *Bam*H Ⅰ及 *Pst* Ⅰ没有切点外，*Ava* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ为单切点，*Xba* Ⅰ、*Sca* Ⅰ为3个切点，*Sac* Ⅰ为4切点，*Eco*R Ⅰ、*Pvu* Ⅱ、*Hind* Ⅲ为5切点，用双酶切法所制作的 mtDNA 的酶切图谱如图1。

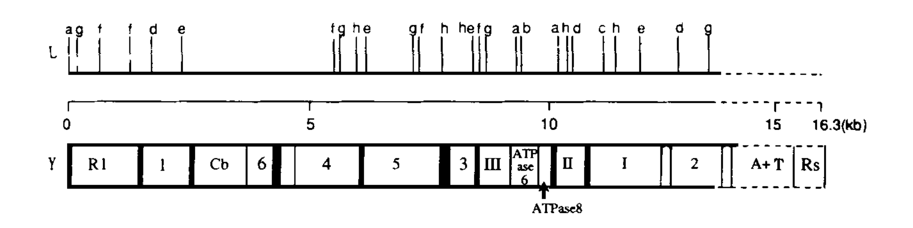


图1　林氏果蝇线粒体 DNA 酶切图谱

a：*Xba* Ⅰ，b：*Ava* Ⅰ，c：*Eco*RV，d：*Sca* Ⅰ，e：*Sac* Ⅰ，

f：*Eco*R Ⅰ，g：*Hind* Ⅲ，h：*Pvu* Ⅱ，（*Bam*H Ⅰ和 *Pst* Ⅰ没有限制位点）

L：*D. lini* 的 mtDNA 酶切图；Y：*D. yakuba* 的 mtNDA 基因图（引自 Clary and Wolstenholme[15]）

与 *D. kikkawai* 的 mtDNA 酶切图（Kim，实验室交流）进行位点比较（图2），我们所用的内切酶有5个与 Kim 所用的酶相同，分别是 *Xba* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Ava* Ⅰ，其中 *Xba* Ⅰ、*Ava* Ⅰ的限制位点与 *D. kikkawai* 完全相同，而 *Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ、*Sac* Ⅰ的限制位点数分别比 *D. kikkawai* 多一个，除此之外其它位点均与 *D. kikkawai* 的位点完全相同。而且TAW3 146.1的 mt DNA具有其它种类所共同拥有的保守基因区限制位点，即为大分子 rRNA 基因区的 *Xba* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Eco*R Ⅰ位点。

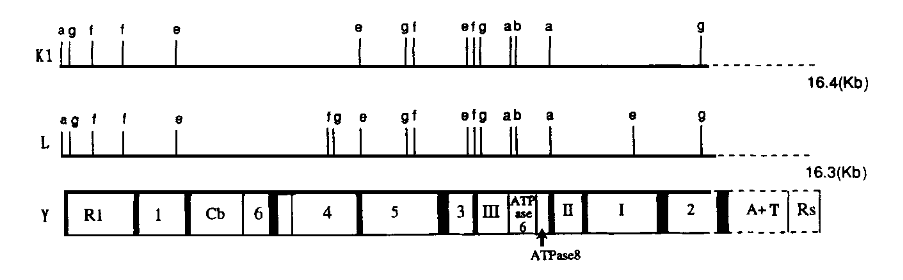


图2 *D. lini* 与 *D. kikkawai* 的 mtDNA 酶切图谱比较

a：*Xba* I，b：*Ava* I，e：*Sac* I，f：*Eco*R I，g：*Hind* Ⅲ

L：*D. lini*；K1：*D. kikkawai*（引自 Kim，实验室交流）；Y：*D. yakuba*（引自 Clary and Wolstenholme[15]）

3 讨论

本实验所用的 mtDNA 提纯方法基本上与 Tamura[1]相同，但为适应林氏果蝇 mtDNA 的大量抽提，在提纯线粒体上改用了研钵研磨，纱布过滤的预处理，然后滤液用大匀浆器匀浆，匀浆的速度及次数是 mtDNA 纯度及得率的关键，匀浆过度影响样品纯度及得率，而匀浆不够则样品得率低，所以，这一步很重要，对于林氏果蝇，以2 000 r/min 上下匀浆5次为宜。此外，用1 mL STE 缓冲液清洗线粒体有助于提高 mtDNA 的纯度。用 Tamura 少量制备的方法每管匀浆50 mg 果蝇所得 mtDNA 可以用于1次酶切反应，用本方法抽提每管所得 mtDNA 可用于12～20次的酶切反应，mtDNA 得率约0. 6～1 μg/g，虽然得率并不比 Tamura 的方法高，但效率却提高了。

70年代初期，Throckmorton 在研究中注意到自然种群中蛋白质的变异，首次把分子生物学的方法引入果蝇的系统进化研究中，他认为在研究物种进化中，分子系统学是非常有用的[4]。除同工酶的研究外，近年来分子生物学技术已逐渐应用于进化遗传的研究中，在果蝇科的 mtDNA 研究中，*melanogaster*、*albomicans*、*virilis*、*obscura* 等种组的某些种类研究最为广泛。其中国外报道得较多，国内也有一些报道，如张慧羽等[5,6]报道了 *D. nasuta*和 *D. albomicans* 的 mtDNA 多态性及进化，王文等[7,8]研究了 *D. albomicans* 自然种群中的 mtDNA 多态性，贾振宇等[9]研究了大陆 *D. virilis* 若干群体的 mtDNA 多态性，均取得可喜的成绩。

D. lini 原采自台湾，自从1968年在台湾采到本实验所用的单雌系 TAW3 146. 1以后，目前在台湾的采集十分困难。1981年在缅甸的 Burma、Rangoon 分别采到 MMY 及 RGN 种群，1992年在广东的鼎湖山、南昆山分别采到 DHS 和 NKS 种群，所有种群的形态，包括外生殖器的特征均难以用于种群或种之间的区分。Ohnishi 和 Watanaba[10]用双向电泳研究 *Montium* 种亚组中29个种的系统进化，发现 *D. lini* 的 MMY326与 TAW3 146. 1品系在 G6pdh 位点上有明显的不同；Kim 等[11]在研究 *Montium* 种亚组 mtDNA 变异中，用14种限制性内切酶对 MMY326和 TAW3 146. 1的 mtDNA 进行酶切，也发现 MMY326和 TAW3 146. 1在 *Hinf* I 和 *Eco*R I 这两个酶的限制性片段格局上有差异；这两项研究仅仅

用了 *D. lini* 的两个品系。Oguma 等[2]研究了各品系的交配行为及生殖隔离，发现缅甸两种群间和中国台湾、广东种群间有明显的生殖隔离。在此基础上温硕洋等[3]研究了 *D. lini* 中国台湾，特别是广东各种群间与缅甸两个种群间的生殖隔离程度，结果与 Oguma 的相似，但我们又有了进一步的发现：广东的两个种群（DHS、NKS）中，品系间与缅甸两种群（MMY、RGN）的生殖隔离的程度有明显的差异，大多数品系与缅甸 MMY、RGN 的杂交子一代为♀性可育，♂性不育，但 DHS410与 RGN 两品系的子一代♀♂性均不育，NKS 9212与 MMY 的正交子一代♂性不育，反交子一代♀♂性均不育。尽管各种群的雄性外生殖器有细微的区别，但尚不足以作为分种的依据，我们试图通过研究 *D. lini* 各种群mtDNA的限制性内切酶酶切片段差异，更全面地了解 *D. lini* 的物种分化程度。自1993年以来我们在 mtDNA 提纯方法上做了多方尝试，结果以本文所报道的方法最适合 *D. lini* mtDNA样品大量制备，在此基础上制作了原产地单雌系 TAW3 146.1的 mtDNA 酶切图谱，为 *D. lini* 的 mtDNA 进化研究打下了基础。

Kim 在研究 *Montium* 种亚组 mtDNA 变异时发现在 *D. kikkawai* 的酶切图谱中，*Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ、*Hae* Ⅲ 和 *Eco*R Ⅰ 这4个限制位点位于靠近富含 A+T 基因区的大分子 rRNA 基因区，这4个位点也出现在其他果蝇种类中[12,13]，Kim 认为大分子 rRNA 基因在果蝇种类分化中是相当保守的，这种现象也在 *D. lini* 中出现。*D. lini* 与 *D. kikkawai* 同属一个复合种组，在5种内切酶的18个限制位点中，*D. lini* 具有15个与 *D. kikkawai* 完全相同的限制位点，具有很大程度的同源性。

目前，我们已对采自缅甸及中国大陆的 *D. lini* 二十多个品系的 mtNDA 的酶切结果进行了比较并进行聚类分析（另文报道），对林氏果蝇的物种分化情况将有更深入的了解。

致谢 本文部分实验在日本东京都立大学进行，我们感谢 O. Kitagawa 和 M. J. Toda 教授、T. Aotsuka、K. Tamura 和陈蕾博士的指导和帮助，谢以权同志参加部分工作，在此一并致谢。

参 考 文 献

1 Tamura K *et al*. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. Biochem. Gene, 1988, **26**:11～12

2 Oguma Y, Wen S Y *et al*. Reproductive isolation between *Drosophila lini* and its siblings. Jpn. J. Genet., 1995, **70**: 311～320

3 温硕洋等. 林氏果蝇生殖隔离研究. 动物学研究，1997，**18**(1)：99～103

4 DeSalle R *et al*. Morphological and molecular systematics of the Drosophilidae. Annu. Rev. Ecol. Syst., 1991, **22**: 447～475

5 Chang H Y *et al*. Mitochondrial DNA polymorphism in *D. albomicans* in Taiwan, Bull. Inst. Zool., 1988, **27**(1):27～35

6 Chang H Y *et al*. Mitochondrial DNA evolution in the *Drosophila nasuta* subgroup of the species. J. Mol. Evol., 1989, **28**:337～348

7 王 文等. 银额果蝇自然群体的 mtDNA 多态性研究 Ⅰ. 银额果蝇自然群体内存在丰富的 mtDNA 多态性. 中国科学(B辑)，1993，**23**(11)：1 158～1 168

8 王 文等. 银额果蝇自然群体的 mtDNA 多态性研究 Ⅱ. 银额果蝇的起源和分化. 遗传学报，1994，**21**(4)：263～274

9 贾振宇等. 中国大陆若干群体的黑果蝇的线粒体 DNA 多态性研究, 动物学研究, 1995, **16**(1): 65～73

10 Ohnishi S, Watanabe T K. Systematics of the *Drosophila montium* species subgroup: a biochemical approach. Zool. Sci., 1984, **1**: 801～807

11 Kim B K *et al*. Evolutionary genetics of the *Drosophila montium* subgroup. Ⅱ. Mitochondrial DNA variation. Zool. Sci., 1993, **10**: 991～996

12 Shah D M, Langley C H. Inter- and intraspecific variation in restriction map of *Drosophila* mitochondrial DNAs. Nature, 1979, **281**: 696～699

13 Solignac M *et al*. Mitochondrial DNA evolution in *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. J. Mol. Evol., 1986, **23**: 31～40

14 Brown W M. The mitochondrial genome of animals. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Plenum Press, 1985, 95～130

15 Clary D O, Wolstenholme D R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J. Mol. Ecol., 1985, **22**: 252～271

A STUDY ON MITOCHONDRIAL DNA OF *DROSOPHILA LINI* (DROSOPHILIDAE)

Wen Shuoyang Xie Li Peng Tongxu

(*Guangdong Institute of Entomology Guangzhou* 510260)

Abstract A sibling species of *Drosophila lini* has been recognized by biochemical analyses (Ohnishi and Watanabe 1984, Kim *et al* 1993). Oguma *et al* (1995) confirmed this fact in their study of courtship behavior and reproductive isolation between *Drosophila lini* and its siblings. We have conducted on postmating reproductive isolation of this species among populations from China (Taiwan, Guangdong) and Burma, the results indicated that reproductive isolation of populations between China and Burma has occurred, even between two populations (MMY and RGN) within Burma.

Mitochondrial DNA of *D. lini* was extracted by a rapid isolation method (Tamura, 1988) with some modifications. The modified method is suitable for large-scale preparation of mtDNA from *D. lini* 10 restriction endonucleases (*Xba* Ⅰ, *Ava* Ⅰ, *Eco*R Ⅰ, *Sac* Ⅰ, *Sca* Ⅰ, *Eco*R Ⅴ, *Hind* Ⅲ, *Pvu* Ⅱ, *Bam*H Ⅰ and *Pst* Ⅰ) were used in this study. The estimated size of *D. lini* mitochondrial genome was 16.3 kb. Restriction map of *D. lini* (TAW 3146.1) mtDNA was established by double-digestion method, 27 cleavage sites were mapped.

Comparison of the restriction map of the *D. lini* mtDNA to that of *D. kikkawai* mtDNA with five restriction endonucleases (*Xba* Ⅰ, *Ava* Ⅰ, *Sac* Ⅰ, *Eco*R Ⅰ and *Hind* Ⅲ) showed that 83.3% of the cleavage sites of *D. lini* were same to those of *D. kikkawai*. There were three cleavage sites in the conservative large rRNA gene region in *D. lini*, these three cleavage sites also occurred in other species of *Drosophila*.

Ked words *Drosophila lini*, mitochondrial DNA, restriction endonucleases, restriction map